

Министерство обороны Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«48 ЦЕНТРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ»
МИНИСТЕРСТВА ОБОРОНЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России)

УТВЕРЖДАЮ

Начальник ФГБУ «48 ЦНИИ»

Минобороны России

доктор биологических наук, профессор,
член-корреспондент РАН



С.В.Борисевич

«27» апреля 2020 г.

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ

установок «Альфа-06» и «Альфа-09» на их эффективность по дезинфекции
металлических поверхностей, контаминированных
коронавирусом SARS-CoV-2

1 ОБЪЕКТ ИСПЫТАНИЯ

1.1 Объектом испытаний являются установки «Альфа-06» и «Альфа-09».

2 ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ИСПЫТАНИЯ

2.1 Цель испытаний - определение эффективности обеззараживания металлических поверхностей, контаминированных коронавирусом SARS-CoV-2 (далее - коронавирус), с использованием установок «Альфа-06» и «Альфа-09».

2.2 Задачи испытаний:

2.2.1 Определение уровня исходной контаминаций поверхностей тест-объектов до их облучения установками «Альфа-06» и «Альфа-09».

2.2.2 Определение уровня остаточной контаминации поверхностей тест-объектов после их облучения с использованием установки «Альфа-06» (образец № 1).

2.2.3 Определение уровня остаточной контаминации поверхностей тест-объектов после их облучения с использованием установки «Альфа-09» (образец № 2).

3 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

3.1 Испытания проводились с учетом основных требований Санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» и Руководства Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях».

3.2 Оцениваемые показатели и расчетные соотношения

3.2.1 Для проведения испытаний в качестве тест-объектов использовались металлические поверхности размером (5×5) см из нержавеющей стали марки 12Х18Н10Т.

Тест-объекты располагали в вертикальном положении на высоте 1 м от пола и расстоянии: для установки «Альфа-06» - 2,0 м; для установки «Альфа-09» - 1,5 м.

Установки располагались согласно схемам предоставленными заказчиком.

3.3.2 Определение биологической концентрации коронавируса (биологической активности, уровней контаминации) проводили на флаконах с монослоем суточного возраста клеток Vero C1008 (площадью 25 см²) методом негативных колоний под агаровым покрытием.

3.3.3 Биологическую активность рассчитывают по формуле 1:

$$A = \frac{a_{cp} \cdot b_n}{c} \quad (1)$$

где: А – биологическая активность, БОЕ·мл⁻¹;

a_{cp} – среднее взвешенное число негативных колоний на флакон, рассчитывали по формуле 2, БОЕ;
 b_n – степень наивысшего разведения;
 c – объем инокулята, мл.

$$A_{cp} = \frac{a_1 + a_2 + \dots + a_n}{b_n \left(\frac{1}{b_1} + \frac{1}{b_2} + \dots + \frac{1}{b_n} \right)} \quad (2)$$

где: a_1 - a_n – среднее число негативных колоний с 1-го по n разведение исследуемого материала;
 b_1 - b_n – степень разведения исследуемого материала.

3.3.4 Уровни контаминации поверхности тест-объектов, соответственно инициальную и вторичную контаминации, рассчитывали по формуле 3:

$$A_s = \frac{A \cdot V}{S} \quad (3)$$

где: A_s – уровень контаминации, БОЕ·см⁻²;
 V – объем сорбирующей жидкости, используемой для смыва биологического материала с поверхности, мл;
 S – площадь контаминации тест-объекта, см².

3.3.5 Статистическую обработку полученных данных проводили на основании вычисления среднего квадратичного отклонения по результатам пяти экспериментов.

4 МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ИСПЫТАНИЙ

4.1 Приборы и оборудование, необходимые для проведения исследований:

- установка «Альфа-06»;
- установка «Альфа-09»;
- термостат MIR 254-PE, объемом 240 л, фирмы Panasonic;
- стерилизатор для медицинских инструментов электрический, ГОСТ 19596-89Е;
- холодильник бытовой «Samsung», 2 кам., мод. RL44ECPS;
- термостат автоматический «Binder», регулировка температуры от 20 до 60 °С, объем 53 дм³, страна производитель США;
- бокс микробиологической безопасности класс II, тип А2, БАВп-01 «Ламинар-С» (220.150) «Lamsystems», ЗАО «Ламинарные системы»;
- электроплитка бытовая по ГОСТ 14919-83Е;
- пробирки бактериологические, ГОСТ 23932-82Е;
- пробки резиновые конусные, ГОСТ 7852-76;

- пипетки мерные 1,0; 5,0 и 10 см³, 2 класс точности, ГОСТ 20292-74Е;
- колбы стеклянные, конические, объемом 100 и 250 см³, ТХС, ГОСТ 25336-82;
- шпатели стеклянные, ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России;
- ножницы глазные остроконечные, изогнутые по плоскости, МРТУ 42-64-66;
- пинцеты медицинские по ГОСТ 21241-75;
- спиртовка лабораторная, ГОСТ 25336-82Е;
- штатив лабораторный, тип СИЛБ, ТУ-79 РФ 265-72-5;
- спринцовка резиновая, ТУ 38.106-141-80;

Средства измерения и приборы, используемые при проведении испытаний, метрологически поверены и аттестованы в соответствии с ГОСТ РВ 8.576-2000 и ГОСТ В 008.002 – 2013.

4.2 Расходные материалы и реактивы, необходимые для проведения исследований:

- рабочая культура вируса SARS-CoV-2 (изолят В) от 16.03.2020 г., с биологической активностью вируса составила $5,8 \cdot 10^6$ БОЕ·мл⁻¹;
- культура клеток Vero 1008;
- биоагар (производства фирмы Difco);
- фетальная телячья сыворотка (производства фирмы HyClone);
- антибиотики для культуры клеток (производства фирмы HyClone);
- нейтральный красный (витальный красный для культуры клеток);
- растворы Хенкса, Ирля, АВК, бикарбоната натрия, глутамата (изготовленных по методикам ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России);
- раствор физиологический по ПР-07-320-35, пропись ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России;
- спирт этиловый, ректифицированный, ГОСТ 18300-72;
- дистиллированная вода, ГОСТ 6709-72;
- карандаш по стеклу, ТУ 46-22-904-78;
- вата медицинская гигроскопическая, ГОСТ 5556-81;
- марля медицинская, ТУ 388-23-501-79;
- перчатки хирургические по ГОСТ 3-88;
- перекись водорода, техническая, марки А, ТУ 2123-002-25665344-2008.

4.3 Персонал, проводящий исследования с микроорганизмами I-II групп патогенности, должен быть обеспечен рабочей и защитной одеждой, средствами индивидуальной защиты и средствами личной гигиены по регламентированным нормам.

4.4 Испытания осуществлялись в «заразной» зоне по условиям максимально изолированной лаборатории.

5 УСЛОВИЯ И ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ

5.1 Испытания проводили в рабочем помещении «заразной» зоны при температуре воздуха $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ и относительной влажности $(42 \pm 3) \%$.

Исходная биологическая активность культуры вируса SARS-CoV-2 (изолят В от 16.03.2020 г.) составила $5,8 \cdot 10^6$ БОЕ·мл⁻¹.

5.2 Испытаниям подвергались тест-объекты размером (5×5) см площадь которых была контаминирована коронавирусом.

5.3 Установки располагались следующим порядком:

- для установки «Альфа-06» - установку располагали боком, к размещенным вертикально на высоте 1,0 м тест-объектам, на расстоянии 2,0 м от них. Поочередно включали режимы: «поверхность-бактерицидный» (далее – режим № 1); «поверхность-спороцидный» (далее – режим № 2); «поверхность-туберкуляцидный» (далее – режим № 3);

- для установки «Альфа-09» - установку располагали боком, к размещенным вертикально на высоте 1,0 м тест-объектам, на расстоянии 1,5 м от них. Поочередно включали режимы: «поверхность-бактерицидный» (далее – режим № 4); «поверхность-спороцидный» (далее – режим № 5); «поверхность-туберкуляцидный» (далее – режим № 6).

Для каждой установки поочередно включали каждый из режимов.

5.3 Эксперименты осуществляли по общепринятым методикам, разработанным в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России и Руководства Р 4.2.2643-10.

5.5 На первом этапе испытаний готовили монослой суточного возраста культуры клеток Vero во флаконах. Для этого из флаконов с монослоем клеток, отобранных для опыта, после термостатирования сливали ростовую среду и маркировали их.

5.6 На тест-объекты наносили по 0,1 мл исходной культуры коронавируса с биологической активностью $1,0 \cdot 10^6$ БОЕ·мл⁻¹. Этот объем равномерно распределяли по всей поверхности тест-объекта стеклянным шпателем.

5.7 Тест-объекты распределялись на контрольные и опытные. Контрольные тест-объекты служили контролем на момент нанесения коронавируса и на время обеззараживания. Для исследований брали по 5 тест-объектов.

5.8 Пробы с тест-объектов до и после облучения отбирали методом смыва двумя марлевыми тампонами (увлажненным и сухим). Каждая проба подвергалась ручному встряхиванию в течение 3 мин в 10 мл сорбирующей жидкости.

5.9 Для определения в пробах биологической активности коронавируса в каждый флакон с монослоем вносили по 0,5 мл соответствующего разведения сорбирующей жидкости и покачивая флакон, равномерно распределяли инокулят по всему монослою.

5.10 Флаконы укладывали горизонтально, при этом поверхность с инфицированным клеточным монослоем находилась внизу. Флаконы инкубировали в термостате при температуре $(37,0 \pm 0,5)$ °С в течение 60 мин.

5.11 После инкубирования инокулят удаляли пипеткой и в каждый флакон вносили по 10 мл первичного агарового покрытия, доведенного до

температуры (42,0±0,5) °С. Далее флаконы укладывали горизонтально, при этом поверхность с инфицированным монослоем находилась внизу.

5.12 После затвердевания покрытия (10-15 мин) флаконы переворачивали монослоем вверх и помещали в термостат с температурой (37,0±0,5) °С на 48 часов.

5.13 По истечении срока инкубации с целью окрашивания монослоя культуры клеток во флаконы вносили вторичное агаровое покрытие, содержащее нейтральный красный, в объеме 10 мл и продолжали инкубировать при температуре (37,0±0,5) °С в течении 24 часов. После чего подсчитывали количество негативных колоний.

5.14 Испытания сопровождалась постановкой следующих контролей:

- контроль исходной биологической активности коронавируса;
- контроль разводящей (сорбирующей) жидкости.
- контроль культуры клеток Vero 1008.

6 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

6.1 Результаты определения уровней исходной и остаточной контаминации тест-объектов, контаминированных коронавирусом, а также эффективность их дезинфекции установкой «Альфа-06» для режимов № 1-3 представлены в таблице 1. Время облучения составляло для режима № 1 – 2,0 мин, режима № 2 – 3,0 мин, для режима № 3 – 6,5 мин.

Таблица 1 – Эффективность дезинфекции тест-объектов установкой «Альфа-06», n=5, $\bar{x} \pm \sigma$

Тип поверхности тест-объекта и его размер	Среднее значение исходного уровня контаминации тест-объекта, на время..., $n \cdot 10^3$ БОЕ·см ⁻²		Значение остаточного уровня контаминации при режиме..., БОЕ·см ⁻²					
	0 мин	6,5 мин	№1		№2		№3	
			единичное	среднее	единичное	среднее	единичное	среднее
Нержавеющая сталь марки 12Х18Н10Т, 5×5 см			0,8		0		0	
			1,6		0		0	
	3,62±0,28	2,95±0,16	0	0,72±0,60	0	0	0	0
			0,8		0		0	
			0,4		0		0	

6.2 Результаты определения уровней исходной и остаточной контаминации тест-объектов, контаминированных коронавирусом, а также эффективность их дезинфекции установкой «Альфа-09» для режимов № 4-6 представлены в таблице 2. Время облучения составляло для режима № 1 – 3 мин 39 с, режима № 2 – 6 мин 45 с, для режима № 3 – 14 мин 03 с.

Таблица 2 – Эффективность дезинфекции тест-объектов установкой «Альфа-09», n=5, $\bar{x} \pm \sigma$

Тип поверхности тест-объекта и его размер	Среднее значение исходного уровня контаминации тест-объекта, на время..., $n \cdot 10^3$ БОЕ·см ⁻²		Значение остаточного уровня контаминации при режиме..., БОЕ·см ⁻²					
	0 мин	14,0 мин	№4		№5		№6	
			Единичное	среднее	единичное	среднее	единичное	среднее
Нержавеющая сталь марки 12Х18Н10Т, 5×5 см	3,62±0,28	2,63±0,21	0,4		0		0	
			0,8		0		0	
			0,4	0,48±0,44	0	0	0	0
			0		0		0	
			0,8		0		0	

6.3 Результаты, представленные в таблице 1, свидетельствуют, что излучение, генерируемое установкой «Альфа-06», приводит к обеззараживанию металлических тест-объектов, контаминированных коронавирусом (3,62±0,28)·БОЕ·см⁻². При этом эффективность обработки составляет 99,98 % на режиме «поверхность-бактерицидный». На режимах «поверхность-спороцидный» и «поверхность-туберкуляцидный» достигается 100% эффективность (полное обеззараживание).

6.3 Результаты, представленные в таблице 2, свидетельствуют, что излучение, генерируемое установкой «Альфа-09», так же приводит к обеззараживанию металлических тест-объектов, контаминированных коронавирусом (3,62±0,28)·БОЕ·см⁻². При этом эффективность обработки достигает 99,99 % на режиме «поверхность-бактерицидный». На режимах «поверхность-спороцидный» и «поверхность-туберкуляцидный» достигается 100% эффективность (полное обеззараживание).

7 ВЫВОДЫ

7.1 Установка «Альфа-06» обеспечивает обеззараживание металлических поверхностей, контаминированных коронавирусом SARS-CoV-2, при режиме «поверхность-бактерицидный» с эффективностью 99,98% и на режимах «поверхность-спороцидный» и «поверхность-туберкуляцидный» с эффективностью 100%.

7.2 Установка «Альфа-09» обеспечивает обеззараживание металлических поверхностей, контаминированных коронавирусом SARS-CoV-2 при режиме «поверхность-бактерицидный» с эффективностью 99,99% и на режимах «поверхность-спороцидный» и «поверхность-туберкуляцидный» с эффективностью 100%.

7.3 Полученные результаты позволяют рекомендовать использование установок «Альфа-06» и «Альфа-09» для обеззараживания поверхностей при проведении противоэпидемических мероприятий по борьбе с распространением коронавирусной инфекции.

Начальник 10 НИО
подполковник

Старший научный сотрудник 10 НИО

Старший научный сотрудник 10 НИО

Старший научный сотрудник 1 НИО

Научный сотрудник 1 НИО

Научный сотрудник 10 НИО

Научный сотрудник 10 НИО

Научный сотрудник 10 НИО

Младший научный сотрудник 10 НИО

А.Зверев

Д.Масякин

Н.Чепуренков

И.Шатохина

Н.Боярская

В.Быков

И.Андрощук

Е.Ковальчук

В.Труфанова